

昆虫味覚受容に関わる分子機構とその多様性

| | |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 著者 | 小金澤 雅之 |
| 号 | 44 |
| 学位授与番号 | 1889 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/38885 |

| | |
|---------|----------------------------------------------|
| 氏名・(本籍) | こ がねざわ まさ ゆき 小金澤 雅 之 |
| 学位の種類 | 博 士 (理 学) |
| 学位記番号 | 理博第1889号 |
| 学位授与年月日 | 平成13年3月26日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科, 専攻 | 東北大学大学院理学研究科(博士課程)生物学専攻 |
| 学位論文題目 | 昆虫味覚受容に関わる分子機構とその多様性 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 嶋 田 一 郎 教授 前 田 靖 男 助教授 山 本 博 章 |

論 文 目 次

序章

- 第1節 はじめに
- 第2節 ハエ味覚受容細胞の構造と特性
- 第3節 本論文の構成
- 補足 略号

第1章 ハエ味覚受容に関わる遺伝子の探索と

Gustatory PBP-related protein類の同定

- 第1節 序論
- 第2節 材料と方法
- 第3節 結果
- 第4節 考察
- 第5節 要約と今後の展望

第2章 ハエ味覚受容細胞のトランスダクション経路

- 第1節 序論
- 第2節 材料と方法
- 第3節 結果
- 第4節 考察
- 第5節 要約と今後の展望

第3章 総合討論

謝辞

引用文献

論文内容要旨

序章

外部の環境についての情報を検知すること—感覚—は、動物が適応的な行動をとるために不可欠なものである。様々な感覚種のうちで全ての動物に共通であるのは「化学感覚」であると思われる。いかなる動物も、栄養源を探知し生命の維持に必要な物質を選択して摂取することが必要だからである。化学感覚が生ずるためには、化学物質の情報が受容細胞の電気的応答に変換されることが必要であり、それがどのような分子機構により成立しているのかを理解することは、化学感覚受容研究の最も大きなテーマの一つである。

本研究で対象とするハエの味覚器は、口器先端の「唇弁」や脚部の先端である「ふ節」に存在する毛の形をした感覚子で、味覚毛と呼ばれる。一本の味覚毛の中には通常4種の味覚受容細胞が含まれ、それぞれ異なる味物質に反応することが明らかとなっている。複雑な脊椎動物の味覚受容系に比べて、ハエの味覚受容系は構造的に単純であり、単一細胞レベルでの電気生理学的研究によく用いられてきた。しかしながら、トランスダクションに関わる主要な分子的要素がすでに同定されている脊椎動物の嗅覚系に比べて、ハエを含めた無脊椎動物の化学感覚受容の分子機構は未解明な点が多い。

本研究は、ハエの味覚受容を成立させている分子機構を理解することを目的とし、第1章では、differentialスクリーニングの手法を応用した、味覚受容組織特異的に発現する遺伝子の同定と、それを通して新たに発見された一群の遺伝子の解析について述べ、それらの味覚受容における機能について考察する。第2章では、G蛋白質に共役したIP₃トランスダクション経路の機能修飾剤を用いた電気生理学的実験により、味覚受容細胞内でこのトランスダクション経路が味物質の受容において機能している可能性を示し、味覚受容細胞におけるトランスダクション経路の多様性について考察する。第3章では第1章及び第2章で述べられた結果をもとに、味覚受容における分子機構の特徴について総合的に考察する。

第1章 ハエ味覚受容に関わる遺伝子の探索とGustatory PBP-related protein類の同定

味覚受容組織のcDNAライブラリーに対してdifferentialスクリーニングを行うことにより、ニクバエの味覚受容組織特異的遺伝子の探索を行った。サブトラクション法により味覚受容組織特異的cDNAを濃縮したものを陽性プローブとし、味覚受容細胞を含まない組織のcDNAを陰性プローブとした。陽性プローブにのみシグナルの見られるプラークを選び、合計418個の味覚受容組織特異的cDNAクローンが得られた。その中に最も多く含まれていたのは、odorant binding protein (OBP)もしくはpheromone binding protein (PBP) 遺伝子に相同性の高い遺伝子群であった。通常、OBPは嗅覚器に特異的に発現し嗅覚受容に関わるとされるが、本研究で同定された遺伝子は味覚受容組織に特異的に発現するという新しいタイプのOBP遺伝子である。味覚受容組織に発現することから、合計7種同定できたこれらの遺伝子を「Gustatory PBP-related protein (GPBPRP)遺伝子」と名付けた。GPBPRPの推定アミノ酸配列間の相同性はきわめて低く(15-25%)多様性に富むものであった。GPBPRP遺伝子のほとんどは味覚受容組織である唇弁とふ節にのみ発現し、嗅覚受容器である触角や頭部、腸などには発現していないことを、virtual Northern解析及びRT-PCR解析により確認した。また、成虫となった雄のガの触角にのみ発現し性フェロモンの受容に関わると考えられているPBPなどとは異なり、GPBPRP遺伝子の発現には性差は観察されず、7つの内4つは幼虫の化学感覚受容器の存在する頭部にも発現していることが観察された。さらに、GPBPRPの配列情報を用いて、ショウジョウバエのゲノムデータベースを検索したところ、GPBPRPに相同性のある多数の推定遺伝子産物が見つかった。これらのアミノ酸配列もGPBPRPと同様にきわめて多様性の高いものであった。

そのうち4つの遺伝子については、GPBPRPと同様に、ショウジョウバエの味覚受容組織に発現していることがRT-PCR解析により確認できた。以上の結果は、GPBPRPのように味覚受容器に特化した多数のOBP類が、昆虫の味覚受容にも関わる可能性をはじめて示唆したものである。

第2章 ハエ味覚受容細胞のトランスダクション経路

私は過去の研究で、ニクバエの味覚受容にはG蛋白質に共役した経路が機能していることを示唆していた。そこで、G蛋白質以降の経路として推定されるIP₃トランスダクション経路に着目して、電気生理学的・薬理学的実験を行い、ニクバエ味覚受容細胞でIP₃経路が機能しているか否かを検討した。まず、PLC（G蛋白質により制御されIP₃を生成する酵素）に対する阻害剤であるneomycinとU73122を、味覚受容細胞内に導入し効果を調べた。その結果、グルコースとフルクトースに対する糖受容細胞の応答が抑制された。それに対して、同じ糖受容細胞を刺激し、その応答にはG蛋白質が関与すると示唆されているL-フェニルアラニンやL-バリンに対する応答には、PLC阻害剤の効果はほとんど観察されなかった。次に、IP₃で開口するチャンネルの阻害剤であるruthenium redを味物質に混合することによる効果を調べた。ruthenium redとの混合によりグルコースに対する糖受容細胞の応答が顕著に抑制され、さらに高濃度のruthenium redの混合では、他の刺激物質に対する糖受容細胞の応答もフルクトース>L-バリン>L-フェニルアラニンの順番で抑制した。これらの結果は、ニクバエ糖受容細胞における糖の受容にはIP₃経路が機能し、アミノ酸類の受容にはG蛋白質は関与するもののIP₃経路はほとんど関与していないことを示唆するものである。糖受容細胞とは対照的に、以上の試薬はcAMPとNaClに対する塩受容細胞の応答には顕著な効果をもたらさなかった。このことは、ニクバエの塩受容細胞にはそもそもIP₃経路が存在せず、G蛋白質関与すると考えられるcAMPの受容に関しても、IP₃以外のセカンドメッセンジャー経路が機能していることを推定させる。IP₃トランスダクション経路が味覚受容において機能しているならば、この経路を構成するG蛋白質やPLC、IP₃チャンネルなどが味覚受容細胞に発現しているはずである。そこで、ショウジョウバエ味覚受容組織における、IP₃トランスダクション経路を構成する蛋白質の遺伝子発現を調べた。G蛋白質として*dGqα*遺伝子を、PLCとして*norpA*遺伝子をIP₃チャンネルとして*itpr*遺伝子に注目しRT-PCR解析を行った。いずれの遺伝子も味覚受容組織である唇弁とふ節に発現していることが確認された。さらに、味覚毛が機械感覚毛に変化し味覚受容細胞の存在しない*poxn*⁷⁰突然変異体を用いて同様の実験を行った。*poxn*⁷⁰突然変異体のふ節では*dGqα*と*itpr*遺伝子の発現が明らかに減少しており、ふ節の組織中ではこれらの遺伝子の発現は味覚受容細胞に比較的特化したものであることが明らかとなった。以上の結果から、ニクバエの味覚受容細胞でIP₃トランスダクション経路が機能し、その構成要素も存在していることが示された。さらに、各々の味覚受容細胞では異なる複数種のトランスダクション経路が並存して機能しているという特徴が示唆された。このような複数種経路の並存は嗅覚受容細胞では報告がなく、味覚受容細胞の重要な特性である可能性がある。

第3章 総合討論

第1章で同定したGPBPRPはきわめて大きな配列上の多様性を持ち、同様な多数の遺伝子がショウジョウバエでも確認された。脊椎動物にも類似の蛋白質が嗅覚受容組織中に存在しているが、種類数は少なくGPBPRPのような配列上の多様性もない。一方、同定されている化学感覚受容体遺伝子の数を、脊椎動物と昆虫（ショウジョウバエ）との間で比較すると、圧倒的に脊椎動物の方が種類が多い。OBPと受容体の遺伝子数を比較すると、OBP遺伝子の種類数の受容体遺伝子の種類数に対する割合は明らかにショウジョウバエの方が脊椎動物よりも大きいことがわかる。このことは、昆虫OBPの化学感覚受容における相対的な重要性を示すものであると思われる。昆虫の化学感覚受容では味覚も含めて、受容体の種類

数は少ないものの、多様なOBP類との協調という分子機構を持つことにより、脊椎動物に匹敵するような受容能を獲得している可能性がある。

生体外の化学物質を受容するという共通性はあるが、味覚と嗅覚には様々な差異がある。たとえば、味覚は5つの「基本味」に分類でき、生体にとってそれぞれ異なる意味を持っているが、嗅覚には「基本臭（原香とよばれる）」は存在しない。味覚と嗅覚の生体にとっての意味の違いは、受容の分子メカニズムの違いとして実現されている可能性がある。第2章で示唆された、ニクバエ味覚受容における複数種のトランスダクション経路の共存はその一例であると考えられる。脊椎動物でも味覚受容細胞でのトランスダクション機構は、嗅覚器におけるそれよりも複雑であることが示されており、味覚と嗅覚の差異を成立させている基盤として、味覚受容におけるトランスダクション機構の多様性が存在すると推定される。

論文審査の結果の要旨

小金澤雅之提出の論文は、これまでほとんど不明であった昆虫（ニクバエ）の味覚受容の分子機構を解明しようとしたものである。第1章では、differential スクリーニングの手法を応用して、味覚受容組織特異的に発現する遺伝子の同定し、それを通して新たに発見された一群の Gustatory PBP-related protein (GPBPRP)と命名した遺伝子の解析を行った。合計7種同定されたGPBPRP遺伝子は、触角などの嗅覚器に特異的に発現し嗅覚受容に関わるとされるodorant binding protein (OBP)と pheromone binding protein (PBP) 遺伝子に相同性が高かった。これらGPBPRP間の推定アミノ酸配列の相同性は極めて低く多様性に富む。又大部分は味覚受容組織である唇弁とふ節にのみ発現し、触角、頭部、腸などには発現していないことを明らかにした。これらは、味覚受容器に特化したGPBPRPのような多様なOBP類が、昆虫の味覚受容に関わる可能性を初めて示唆したものである。第2章では、ニクバエ味覚受容細胞のトランスダクション経路として、イノシトール3リン酸 (IP_3) の経路が機能しているか否かを、電気生理学的・薬理学的実験により検討した。 IP_3 を生成する酵素PLCの阻害剤のneomycinやU73122を味覚受容細胞内に導入し、また、 IP_3 で開口するするチャネルの阻害剤ruthenium redを味物質に混合することによりそれらの効果を調べた。いずれもグルコースなどの糖類に対する糖受容細胞の応答が顕著に抑制されたが、アミノ酸類に対する応答には阻害効果はほとんど観察されず、また、塩受容細胞の応答には顕著な効果が見られなかった。これらの結果などから、ニクバエ糖受容細胞における糖の受容には IP_3 経路が機能し、アミノ酸類の受容にはほとんど関与しておらず、塩受容細胞には IP_3 経路が存在していないことが示唆され、各味覚受容細胞では複数種のトランスダクション経路が併存しているという特徴が示唆された。第3章の総合討論では、ニクバエ味覚受容におけるGPBPRPやトランスダクション経路の多様性の意義を、広く化学受容の世界の中で展開した。以上のように本論文はこれまで不明であった昆虫の味覚受容の分子機構とその多様性を初めて解明したものであり、著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、小金澤雅之提出の博士論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。